



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12M 1/00, C12Q 1/68, C12N 15/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/40173</p> <p>(43) 国際公開日 1999年8月12日(12.08.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00524</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月8日(08.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/41035 1998年2月9日(09.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋鋼板株式会社(TOYO KOHAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒100-8911 東京都千代田区霞が関一丁目4番3号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 丹花通文(TANGA, Michifumi)(JP/JP) 〒744-8611 山口県下松市東豊井1296番地の1 東洋鋼板株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP) 高橋浩二郎(TAKAHASHI, Kojiro)(JP/JP) 〒734-0015 広島県広島市南区宇品御幸一丁目9番26号 Hiroshima, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 太田明男(OHTA, Akio) 〒100-8911 東京都千代田区霞が関一丁目4番3号 東洋鋼板株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: SUBSTRATES FOR IMMOBILIZING AND AMPLIFYING DNA, DNA-IMMOBILIZED CHIPS HAVING DNA IMMOBILIZED ON THE SUBSTRATES, AND METHOD FOR AMPLIFYING DNA</p> <p>(54)発明の名称 DNAを固定化して増幅するための基体、その基体にDNAを固定化したDNA固定化チップ及びDNAを増幅する方法</p> <p>(57) Abstract Substrates for immobilizing DNA, etc. to give DNA libraries, etc.; and chips appropriately usable in amplifying DNA, etc. by PCR amplification. The PCR amplification is effected by using highly conductive solid substrates for immobilizing DNA. These substrates are surface-modified with chemicals having polar groups at the terminals. Use of the DNA-immobilized chips having DNA immobilized on these substrates makes it possible to amplify DNA within a short time in the PCR method.</p>		

本発明は、DNA等を固定してDNA等のライブラリーとして用いるための基体の提供、さらには、PCR増幅反応によりDNA等を複製するために使用するのに最適な基体をチップを提供することを目的とする。このため本発明では、伝導性に優れたDNA固定化用固体状基体を利用してPCR増幅法を行う。この基体の表面は、末端に極性基を有する化学修飾されたものである。また、これらの基体にDNAを固定化したDNA固定化チップを用いるとPCR法においてDNAを短時間で増幅できるという特徴を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レント	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TG チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TD トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	ML モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴリア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR モーリタニア	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	VN グイエトナム
CH スイス	IN インド	MX メキシコ	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NO ノールウェー	
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	RU ロシア	
EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン	
		SE スウェーデン	

明 細 書

DNAを固定化して増幅するための基体、その基体にDNAを固定化したDNA
固定化チップ及びDNAを増幅する方法

5

技術分野

本発明は、分子生物学分野や生化学関連分野において用いられるDNA等を固
定化するための基体に関し、より詳しくは、熱伝導性に優れた基体に関し、さら
に詳しくは、末端に水酸基、カルボキシ基、エポキシ基、アミノ基等を有する
10 化学修飾された基体及びその基体にDNA等を固定化したチップに関する。

背景技術

従来、DNAの増幅反応等においては、目的とするDNAを特定量得るために、
1) 二本鎖DNAの水素結合をほどくために試料の温度を95℃に上昇させる、
15 2) 次いでDNAを複製するためのプライマーと再結合させるために試料の温度
を45℃に下降させる、
3) さらに耐熱性ポリメラーゼによりプライマーを伸長させてDNAを複製させ
るために試料の温度を74℃に上昇させる、
といった1)～3)のヒートサイクルを幾度も繰り返す必要があった。
20 このような、いわゆるPCR法を用いたDNAの増幅反応では、試料を反応溶
液とともにチューブ状プラスチック反応容器などに入れ、この容器をアルミブロ
ックに収容し前記ヒートサイクルを行っていた。

しかし、前記増幅反応はDNAを反応溶液とともに加熱・冷却を行うために、
目的とする量のDNAを得るには多大な時間を要していた。また、反応溶液の温
25 度制御の精度が低いために、目的とする以外のDNAも複製されるという問題点
もあった。

本発明は、このような問題点に鑑み、DNA等を容易に固定化できて、DNA増幅反応によりDNAを複製するために最適な固体状基体、その基体にDNA等を固定化したチップ、及びDNAを増幅する方法を提供することを技術的課題とする。

5

発明の開示

本発明の基体は、DNAを固定化して増幅するための熱伝導性に優れていることを特徴とする。これらの基体はダイヤモンドであることが望ましく、化学修飾されたものであることが望ましい。

10 これらの基体は、末端に極性基、水酸基、カルボキシル基、エポキシ基、またはアミノ基を有する化学修飾されたものであることが望ましい。

そして、前記カルボキシル基が、エステル結合やペプチド結合を介して基体表面に結合しているもの、或いはシランカップリング剤により基体表面に導入されたものであり、また前記エポキシ基、またはアミノ基がシランカップリング剤により基体表面に導入されたものであることが望ましい。

15

本発明のDNA固定化チップは、これらの基体にDNAを固定化したものであることを特徴とする。

本発明のDNAを増幅する方法は、これらの基体又はチップを用いてDNAを増幅することを特徴とする。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明の基体は、DNAを固定化して増幅するために用いる固体状の基体であって、熱伝導性に優れたものであることが望ましい。例えば、ダイヤモンドは物質の中でも抜群の熱伝導率を有しており急速に加熱冷却させることが可能であるため、本発明の基体を用いれば、DNA増幅反応のように、加熱冷却を繰り返すヒートサイクル時間をきわめて短縮できる。

25

また、本発明の基体は、表面を水酸基、カルボキシル基、エポキシ基、アミノ基等で化学修飾してあるので、DNA等の固定化を容易に行え、DNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップなどに最適である。

また、本発明のチップは、表面が汚染された場合に、加水分解させて化学修飾を再生させることができる。

本発明に用いる基体は、例えば、固体状の基体は熱伝導率が $0.1 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上であることが望ましい。

さらに、好ましくは熱伝導率が $0.5 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上であることが望ましい。

さらに、より好ましくは熱伝導率が $1 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上であることが望ましい。

10 基体の熱伝導率が $0.1 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ 以上であると、DNAを本発明の基体に固定化させ、PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）反応を行う場合等において、加熱・冷却の追従性が優れているからである。

熱伝導性がよいものの例としては、ダイヤモンド、銀、銅、アルミニウム、タングステン、モリブデン等の金属などがあげられる。また、アルミナ、窒化アルミニウム、炭化チタン、炭化珪素、シリコン、等のセラミックスがあげられる。
また、上記の金属とセラミックスとの混合体も適用出来る。また、ポリカーボネートやフッ素樹脂等のプラスチックなども適用できる。また、化学的に安定なものであれば、上記した金属、セラミックス、プラスチックに限定されない。例えば、ダイヤモンドやダイヤモンドライクなども適用できる。また、プラスチックと上記金属、セラミックス、ダイヤモンド等との混合体でもよい。

20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250
ダイヤモンド基体の素材としては、合成ダイヤモンド、高圧合成ダイヤモンド、あるいは天然のダイヤモンドなどを用いることができる。またそれらの単結晶体あるいは多結晶体のいずれの構造を有していても差し支えない。生産性の観点から、マイクロ波プラズマCVD法などの気相合成法を用いて製造されたダイヤモンドを用いることが好ましい。

本発明の基体の形成方法は適宜選択できる。例えば、マイクロ波プラズマCVD

D法、ECRCVD法、高周波プラズマCVD法、IPC法、直流スパッタリング法、ECRスパッタリング法、イオンプレーティング法、アーキイオンプレーティング法、EB蒸着法、抵抗加熱蒸着法などがあげられる。また、金属粉末やセラミックス粉末等に、樹脂をバインダーとして混合して結合形成したものがあげられる。また、金属粉末やセラミックス粉末等の原料をプレス成形機を用いて圧粉したものを高温で焼結したものもあげられる。

本発明の基体表面は、意図的に粗面化されていることも望ましい。このような粗面化表面は基体の表面積が増えて、多量のDNA等を固定化させることに好都合だからである。基体の形状は、平板状、糸状、球状、多角形状、粉末状など特に問わない。さらにこれらの基体と他の物質との複合体（例えば2層体）であってもよい。

本発明の基体は、基体表面を化学修飾されたものであり、化学修飾の末端に極性基、水酸基又はカルボキシル基を有するものであることが好ましい。すなわち、上記の基体の表面に特定の基を付加（化学修飾）させる。この化学修飾によって、DNAが基体の表面に固定化されやすくなる。基体表面に付加（化学修飾）され、末端に極性基を有する特定の基としては、水酸基、カルボキシル基、硫酸基、シアノ基、ニトロ基、チオル基、アミノ基、エポキシ基などの基があげられる。また、この他、有機カルボン酸も含まれる。前記の基のうち、カルボキシル基は、ダイヤモンドなどの基体に直接付加させてもよいが、基体との間に他の炭化水素基を介し、末端にカルボキシル基を有することとしてもよい。

この場合の炭化水素基は炭素数1～10のものが、DNAの固定化にあたって好ましい。炭化水素基となりうるような酸は、蟻酸、酢酸、プロピオン酸などのモノカルボン酸や、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸などのジカルボン酸や、トリメリット酸などの多価カルボン酸などがあげられる。

PCR法などを用いて、DNAの増幅反応に本発明の基体を適用する場合、耐

加水分解性が必要とされる場合と、加水分解させて化学修飾を再生させる必要がある場合との2通りの適用ケースがある。

耐加水分解性が必要とされる場合は、耐アルカリ性を付与するために、上記の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基を、ペプチド結合を介して基体表面に結合させることが好ましい。

一方、生成した化学修飾を加水分解させて除去し再生させる必要がある場合は、アルカリ溶液で加水分解可能とするために、上記の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基を、エステル結合を介して基体表面に結合させることが好ましい。

炭化水素基の末端に水酸基を基体表面に結合させる方法としては、基体表面を酸素プラズマで酸化し、次いで水蒸気処理する方法、または塩素ガス中で紫外線照射して基体表面を塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法、さらに基体表面を酸素プラズマで酸化し、次いで塩素化した後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化する方法を挙げることができる。

なお、基体表面に水酸基が結合されている場合は、シランカップリング剤、チタンカップリング剤、アルミカップリング剤などをその上に処理すると、カルボキシル基などとの化学修飾がより強固なものになる。

また、炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基をペプチド結合を介して基体表面に結合させる方法としては、塩素ガス中で紫外線照射して基体表面を塩素化し、次いでアンモニアガス中で紫外線照射してアミノ化した後、非水溶媒中でカルボン酸クロライドと反応させ、次いで弱アルカリ溶液中で中和させる方法を挙げることができる。

また、炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基をエステル結合を介して基体表面に結合させる方法としては、塩素ガス中で紫外線照射して基体表面を塩素化し、次いで非水溶媒中でカルボン酸ソーダと反応させ、次いで弱酸溶液中で中和させる方法、または、基体表面を酸素プラズマで酸化し、次いで塩素化し

た後アルカリ溶液中で加水分解してヒドロキシル化した後、非水溶媒中でカルボン酸クロライドと反応させ、次いで弱アルカリ溶液中で中和させる方法を挙げることができる。以下、実施例にて本発明を詳細に説明する。

(実施例 1)

5 マイクロ波プラズマ CVD 法を用いて、直径が 6.4 mm、厚さが 0.3 mm のダイヤモンドを気相合成した後、全体が均一な 0.25 mm の厚さとなるよう表面を研磨した。このようにして研磨した表面の 10 mm × 10 mm の面積において、FTIR 法（フーリエ変換赤外分光分析法）により炭素－水素の伸縮の振動
10 により出る 2879 cm^{-1} の吸収強度を測定したところ、ほぼ一定の値が得られた。このダイヤモンドからレーザーにより 10 mm 角の試料を切り出し、以下の実施例 1～6 の試料として用いた。実施例 1 においては、マイクロ波により励起した酸素プラズマでダイヤモンド表面を酸化した後、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気水を水蒸気で置換した後、水蒸気を流入させながら 400 °C に加熱し 30 分間保持した後放冷した。

15 次に試料を取り出し乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMS 法（二次イオン質量分析法）により、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、および水蒸気処理後の水素、水酸基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を 1 とした場合の水酸基のピーク強度比は、下記の表 1 に示す値となった。

20

表 1	
工 程	水酸基のピーク強度比
表 面 研 磨 後	0.14
酸素プラズマ処理後	0.70
水蒸気処理後	1.14

25 表 1 に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く水蒸気処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾され

ていることが確認された。

(実施例 2)

実施例 1 で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより 10 mm 角の試料を切り出した。この試料をセバラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した後、塩素ガスを 1 S C C M の流量で流入させながら H g - X e ランプを用い、主波長が 3 6 0 0 オングストロームの紫外線を 6 0 分間照射してダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気アルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10 重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で 1 5 分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。

また、S I M S により、表面研磨後、塩素化後、および水酸化ナトリウム処理後の水素、水酸基および塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を 1 とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は下記の表 2 に示す値となった。

表 2		
工 程	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
塩素化後	0.20	0.50
水酸化ナトリウム処理後	0.47	0.35

表 2 に示すように、水酸基のピーク強度比は、塩素化処理、それに続く水酸化ナトリウム処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾されていることが確認された。また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

(実施例 3)

実施例 1 で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより 10 mm 角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を酸化

した後、実施例 2 と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10 重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で 15 分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMS により、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、塩素化後、
 5 および水酸化ナトリウム処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を 1 とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は、表 3 に示す値となった。

表 3		
工 程	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
酸素プラズマ処理後	0.70	—
塩素化後	0.21	0.47
水酸化ナトリウム処理後	0.54	0.33

15 上記表 3 に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続く水酸化ナトリウム処理により増加しており、ダイヤモンド表面が水酸基により化学修飾されていることが確認された。また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

(実施例 4)

20 実施例 1 で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより 10 mm 角の試料を切り出し、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気をアルゴンガスで置換した後、塩素ガスを 1 SCCM の流量で流入させながら Hg-Xe ランプを用い、主波長が 3600 オングストロームの紫外線を 60 分間照射してダイヤモンド表面を塩素化した。再びフラスコ中の雰囲気をアルゴンガスで置換した後、1 重量%のセバシン酸ソーダの N, N-ジメチルホルムアミド
 25 溶液 100 ml を添加し、セパラブルフラスコにコンデンサを設置し、2 時間還

流した。次いで試料を取り出し、1重量%の酢酸水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、セバシン酸がエステル結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、表面研磨後、塩素化後、およびセバシン酸ソーダ処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の、水酸基、塩素基のピーク強度比は、表4に示す値となった。

表 4		
工 程	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
表面研磨後	0.14	—
塩素化後	0.20	0.50
セバシン酸ソーダ処理後	0.40	0.34

表4に示すように、水酸基のピーク強度比は、塩素化、さらにそれに続くセバシン酸ソーダ処理により増加していること、またFTIR法を用いて試料表面の炭素—水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素—酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約30%であった）。

このことから、ダイヤモンド表面がセバシン酸の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

また、塩素基が減少していることから水酸基により置換されたことが確認された。

(実施例5)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを表面研磨し、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を酸化した後、実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化カリウム水溶液中で1

5 分間煮沸してダイヤモンド表面をヒドロキシル基で置換した。乾燥した後、上部に塩化カルシウム乾燥管を備えたコンデンサを設置したセパラブルフラスコ中に試料を配置し、クロロホルム 50 ml とトリエチルアミン 1 g を添加し、フラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した。次いで、セパラブルフラスコを氷冷しながら、クロロホルム 50 ml に塩化スクシニル 10 g を溶解させた溶液を徐々に添加した。その後 4 時間還流した後試料を取り出し、10 重量%の炭酸カリウム水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、マロン酸がエステル結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMS により、表面研磨後、酸素プラズマ処理後、塩素化後、ヒドロキシル化後、および塩化スクシニル処理後の水素、水酸基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を 1 とした場合の水酸基のピーク強度比は、表 5 に示す値となった。

表 5	
工 程	水酸基のピーク強度比
表 面 研 磨 後	0.14
酸素プラズマ処理後	0.70
塩 素 化 後	0.21
ヒドロキシル化後	0.70
塩化スクシニル処理後	0.50

表 5 に示すように、水酸基のピーク強度比は、酸素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続くヒドロキシル化、さらにそれに続く塩化スクシニル処理により増加していること、また FTIR 法を用いて試料表面の炭素－水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素－酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約 25% であった）。

このことから、ダイヤモンド表面がマロン酸の炭化水素基の末端にカルボキシ

ル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

(実施例6)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドを、レーザーにより10mm角の試料を切り出し、マイクロ波により励起した水素プラズマで表面を処理した後、実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。

試料が配置されたセパラブルフラスコ中の雰囲気アルゴンをアルゴンガスで置換した後、アンモニアガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射してダイヤモンド表面をアミノ化した。雰囲気アルゴンをアルゴンガスで置換した後、セパラブルフラスコ上部に塩化カルシウム乾燥管をそなえたコンデンサを設置し、クロロホルム50mlを添加し、再び雰囲気アルゴンをアルゴンガスで置換した。

次いで、セパラブルフラスコを氷冷しながら、クロロホルム50mlに塩化スクシニル10gを溶解させた溶液を徐々に添加した。その後4時間還流した後試料を取り出し、10重量%の炭酸カリウム水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、マロン酸がペプチド結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有するダイヤモンドを得た。また、SIMSにより、各種処理前、塩素化後、アミノ化後、および塩化スクシニル処理後の水素、水酸基、塩素基のピーク強度を測定したところ、水素のピーク強度を1とした場合の水酸基、塩素基のピーク強度比は、表6に示す値となった。

表 6

工 程	ピーク強度比	
	水酸基	塩素基
水素プラズマ処理後	0.06	—
塩 素 化 後	0.21	0.47
ア ミ ノ 化 後	0.18	0.10
塩化スクシニル処理後	0.58	0.10

表 6 に示すように、水酸基のピーク強度比は、水素プラズマ処理、それに続く塩素化、さらにそれに続くヒドロキシル化、さらにそれに続く塩化スクシニル処理により増加していること、また F T I R 法を用いて試料表面の炭素－水素の伸縮振動に由来する吸収強度、および炭素－酸素の伸縮振動に由来する吸収強度を測定したところ、いずれの吸収強度も増大していた（ダイヤモンドブランクに対する吸収強度の増大率は約 25%であった）。このことから、ダイヤモンド表面がマロン酸の炭化水素基の末端にカルボキシル基が結合した基により化学修飾されていることが確認された。

実施例 1～6 のようにして得られた末端にカルボキシル基を有する化学修飾されたダイヤモンドチップを用いて DNA の増幅反応を実施したところ、約 1 時間で目的とする量の DNA を得ることができた。

さらに本発明の化学修飾されたダイヤモンドチップを用い、末端水酸基または末端カルボキシル基に、水素結合でオリゴ核酸の末端塩基を固定化し、さらに、このオリゴ核酸と相補的塩基配列を有する DNA を固定して、DNA ライブラリチップとして用いることもできる。また、DNA のかわりに、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA フラグメント等を、ダイヤモンド表面に固定化して、ライブラリーとすることもできる。

（実施例 7）

高周波プラズマ CVD 法を用いて、直径が 6.4 mm、厚さが 0.1 mm の表面粗さが Ra で 0.1 mm の炭化チタンの円板を気相合成した。この円板からレーザーにより 3×5 mm 角の試料を切り出し、熱伝導率を測定した結果、0.44 W/cm・K の値が得られた。

実施例 7 においては、高周波により励起した酸素プラズマで試料表面を酸化した後、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気の水蒸気で置換した後、水蒸気を流入させながら 400℃ に加熱し 30 分間保持した後放冷した。次いで試料を取り出し乾燥し、末端に水酸基を有する基体を得た。さらにこの基体

表面をシランカップリング溶液中にディップして基体表面にシランカップリング剤を被覆した基体を得た。この基体を加熱冷却手段であるペルチェ素子に直接接触させて基体の温度制御ができるようにして、以下のPCR法を行った。

(DNAの固定化)

- 5 まず、基体表面に、mRNA (messenger RNA: メッセンジャーRNA) の場合はオリゴ-dT₁₆₋₂₀ を固定化した。一方gDNA (genomic DNA: 染色体DNA) の場合は目的の制限酵素部位を持ったオリゴヌクレオチドを、化学的なエステル結合反応によって固定化した。次に、cDNA (complementary DNA) 固定化の場合、組織・細胞から抽出した全RNA溶液を加えて0～4℃の低温でmRNA
10 を固定化オリゴ-dT₁₆₋₂₀ にハイブリダイズさせた後に、基体温度を37～60℃に温度制御して、逆転写酵素 (Reverse Transcriptase: RT) によってcDNA合成を行った。このときのcDNAは、固定化オリゴ-dT₁₆₋₂₀ の5' へ向けての延長反応させ固定化したものを用いた。

- 合成された固定化cDNAとmRNAとのハイブリダイズ状態にある溶液を9
15 0℃に昇温させてmRNAを脱ハイブリダイズした後、反応溶液をTris-E DTA (TE) 緩衝液に交換し、再度0～4℃の低温にしてエタノール洗浄し、一本鎖DNAの状態の精製された固定化cDNAチップを作製した。

- gDNA固定化の場合は、まず、目的の制限酵素部位を持った固定側オリゴヌクレオチドを上記のオリゴ-dT₁₆₋₂₀ の場合と同様に本発明の基体表面に固定
20 化した。次に、その化学的な固定化のための反応溶液を0～4℃の低温でハイブリ側オリゴヌクレオチドと目的の制限酵素を含む反応溶液に交換した。そして、オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション後、37℃にまで昇温して半固定化されたオリゴヌクレオチドの制限酵素切断を行った。

- 制限酵素切断後に、基体温度を0～4℃の低温にして、目的の制限酵素で断片
25 化したgDNAとライゲーション酵素 (Ligase) を含む反応溶液に交換し、再び基体温度を37℃にまで上昇させてライゲーション反応を行い、一本鎖DNAの

状態の g DNA 固定化チップを作製した。

なお、基体表面上に上記作製された c DNA 固定化チップ或いは上記作製された g DNA 固定化チップを、

- ①多検体での同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較、
 - 5 ②同一検体での各組織・細胞の遺伝子発現変動の比較、
 - ③同一検体での治療・手術等に伴う余後経過に対応する遺伝子発現変動の比較、
- 等を目的として、それぞれを別の容器内に設置することもできる。

たとえば①の場合は、同種の組織・細胞の遺伝子変異の比較をするために、多検体（複数の DNA 固定化チップ）を、別の容器中に設置し、これらの複数の容器を連結した 1 カセットとする。そしてこれらのカセットを反応器本体に埋設する。さらにこれらのカセットを 2 カセット以上を系統的に作れば、効率的に多検体の比較を行うことができる。

上記、複数の容器を連結した 1 カセットあるいは複数のカセツカセットを集合体にして、これらのそれぞれの容器内に DNA 固定化チップを設置したものを、
15 カセット型 DNA ライブラリーとすることができる。

これらのカセット型 DNA ライブラリーを用いて、前記①～②の比較を系統的に行うことによって、遺伝子の変動を効率的に調査することもできる。

そして、本発明の DNA 固定化チップを、TE 緩衝液及び 70～75% のエタノール水溶液で十分に洗浄後、100% エタノールに浸潤して冷凍保存すれば、
20 比較データ等の要求に応じて半永久的に利用可能である。

（DNA 固定化チップを用いての遺伝子増幅）

上記の c DNA 固定化チップの複数枚を用いて反応容器を構成し、加熱・冷却手段に調節接触させた。この反応容器内面を TE 緩衝液で十分に洗浄後、増幅目的の DNA に対するプライマーをセットし、4 種のヌクレオチド及び DNA ポリ
25 メラーゼを含む PCR 反応溶液を加えた。その後、反応容器を、二本鎖の DNA を一本鎖 DNA に分離させる熱変性温度（95℃）に瞬時に昇温した。そして 9

5℃で約1.5分間保持した、次に、一本鎖DNAとDNAプライマとを結合させるアニーリング温度である45℃に瞬時に降温した。そして45℃に約1分間保持した。次に、耐熱性DNAポリメラーゼによりDNA鎖の伸長反応を行わせるDNA増幅温度である74℃に升温した。そしてその温度で約2分間保持した。

- 5 上記温度サイクルを30回繰り返してPCRを行った。PCRに要した時間は升温、降温の時間を全く必要としなかったため、保持時間の和である約135分であった。

(実施例8)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドをレーザにより10mm角の試料に
10 切り出し、マイクロ波プラズマにより励起した水素プラズマで表面を処理した後、
実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気アルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化カリウム水溶液中で15分間煮沸してダイヤモンド表面をヒドロキシル化した。一方100ccの95%エタノール-5%水溶液を酢酸でpH5に調整し、2ccの3-グリシドキシプロピル
15 トリメトキシシランを攪拌しつつ添加した。この溶液にヒドロキシルダイヤモンドを浸して取り出し、エタノールで軽く洗浄した後、110℃で5分間処理することによりダイヤモンド表面にエポキシ基を導入した。

(実施例9)

エポキシ基に対して、5'末端アミノ化オリゴ核酸（プライマー）を固定化し
20 て、mRNAをアニールした後逆転写酵素でcDNAレプリカ作製すると同時にチップに固定化した。

(実施例10)

実施例1で得られた気相合成ダイヤモンドをレーザにより10mm角の試料に切り出し、マイクロ波プラズマにより励起した水素プラズマで表面処理した後、
25 実施例2と同様にしてダイヤモンド表面を塩素化した。雰囲気アルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化カリウム水溶液中で15分煮沸

してダイヤモンド表面をヒドロキシル化した。一方100ccの95%エタノール-5%水溶液に2ccの3-アミノプロピルトリメトキシシランを攪拌しつつ添加した。その溶液にヒドロキシル化ダイヤモンドを浸して取り出し、エタノールで軽く洗浄した後、110℃で5分間処理することによりダイヤモンド表面に
5 アミノ基を導入した。

(実施例11)

実施例10で得られたアミノ基導入ダイヤモンド表面に5'末端にカルボキシル基を修飾したオリゴ核酸をペプチド結合で固定化した後、mRNAを鋳型として逆転写酵素によりcDNAをダイヤモンドに固定化した。

10 (実施例12)

アークイオンブレーティング法を用いて、直径が64mm、厚さが0.1mmの表面粗さがRaで0.3mmの窒化アルミニウム円板を気相合成した。この円板をレーザーにより3×5mm角の試料を切り出し、熱伝導率を測定した結果、
1.70W/cm・Kの値が得られた。この試料をセパラブルフラスコ中に配置
15 し、フラスコ中の雰囲気アルゴンガスで置換した後、塩素ガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射して試料表面を塩素化した。雰囲気アルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で15分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有する基体を得た。その後、
20 この基体を用いて、実施例1と同様にして、DNAの固定化及びPCR法を利用した増幅を行った。

(実施例13)

粉末焼結法を用いて、直径が64mm、厚さが0.3mmの表面粗さが平均表面粗さRaで0.5mmのタングステン円板を得た。この円板からレーザーにより
25 3×5mm角の試料を切り出し、熱伝導率を測定した結果、1.67W/cm・Kの値が得られた。そして、マイクロ波により励起した酸素プラズマで表面を

酸化した後、試料表面を塩素化した。雰囲気をアルゴンガスで置換した後試料を取り出し、10重量%の水酸化ナトリウム水溶液中で15分間煮沸し、さらに水洗した後乾燥し、末端に水酸基を有する基体を得た。その後、この基体を用いて、実施例1と同様にして、DNAの固定化及びPCR法を利用した増幅を行った。

5 (実施例14)

粉末焼結法によりアルミナ円板を形成し、この円板をレーザーにより 3×5 mm角の試料を切り出し、熱伝導率を測定した結果、 $0.3 \text{ W/cm} \cdot \text{K}$ の値が得られた。そして、セパラブルフラスコ中に配置し、フラスコ中の雰囲気をアルゴンガスで置換した後、塩素ガスを1SCCMの流量で流入させながらHg-Xeランプを用い、主波長が3600オングストロームの紫外線を60分間照射して試料表面を塩素化した。再びフラスコ中の雰囲気をアルゴンガスで置換した後、1重量%のセバシン酸ソーダのN,N-ジメチルホルムアミド溶液100mlを添加し、セパラブルフラスコにコンデンサを設置し、2時間還流した。次いで試料を取り出し、1重量%の酢酸水溶液で洗浄し、さらにアセトンで洗浄した後乾燥し、セバシン酸がエステル結合を介して結合した、末端にカルボキシル基を有する基体を得た。その後、この基体を用いて、実施例1と同様にして、DNAの固定化及びPCR法を利用した増幅を行った。

なお、本発明の基体やDNAチップは、上記のようにサーミスタ等の加熱・冷却手段に直接接触させて用いる他に、従来のPCR法でのDNA増幅法のようにエッペン型チューブ内の反応液中に投入して用いることもできる。この場合には、前述の実施例に記載したようにきわめて短時間でPCR増幅法を終了させることはできないが、従来行われていた反応液中にDNAを投入する方法よりも迅速に終了させることができる。

25 産業上の利用可能性

本発明においては、熱伝導率に優れた基体を用いたことにより、PCR法を用

いたDNA増幅反応をきわめて短時間に終わることができる。

また、基体に直接加熱・冷却手段を接触させて基体を加熱・冷却することによって、前記PCR反応の温度制御も精度よく行えるために、増幅目的以外のDNAはほとんど複製されないという利点がある。

- 5 また、本発明の基体は、熱伝導性に優れた固体状基体にDNAを直接固定化しているもので、基体の温度を直接加熱・冷却させることによって、PCR法等によるヒートサイクルの追従性を向上させることができ、目的とする量のDNAを短時間で得ることができる。

- (c) また、本発明の基体は、表面を水酸基、カルボキシル基、エポキシ基、アミノ基等で化学修飾してあるので、DNA等の固定化の安定化を図れ、PCR法などを用いてDNA増幅反応によりDNAを複製するためのチップなどに最適である。

また、本発明の基体は、表面が汚染された場合に、加水分解させて化学修飾を再生させることができ、高価なDNAチップを節約できる。

請求の範囲

1. DNAを固定化して増幅するための熱伝導性に優れたDNA固定用固体状基体。
- 5 2. 前記基体がダイヤモンドである請求項1の基体。
3. 前記基体が化学修飾されたものである請求項1又は2の基体。
4. 末端に極性基を有する化学修飾された請求項1～3のいずれかに記載の基体。
5. 前記極性基が水酸基、カルボキシル基、エポキシ基、アミノ基である請求
10 項4記載の基体。
6. 前記カルボキシル基が、エステル結合を介して基体表面に結合している請求項5記載の基体。
7. 前記カルボキシル基が、ペプチド結合を介して基体表面に結合している請求項5記載の基体。
- 15 8. 前記カルボキシル基が、シランカップリング剤、チタンカップリング剤又はアルミカップリング剤により基体表面に導入される請求項5記載の基体。
9. 前記エポキシ基が、シランカップリング剤、チタンカップリング剤又はアルミカップリング剤により基体表面に導入される請求項5記載の基体。
10. 前記アミノ基が、シランカップリング剤、チタンカップリング剤又はアル
20 ミカップリング剤により基体表面に導入される請求項5記載の基体。
11. 請求項1～10のいずれかに記載の基体にDNAを固定化したDNA固定化チップ。
12. 請求項1～10記載の基体又は請求項11記載のチップを用いてDNAを増幅する方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12M1/00, C12Q1/68, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12M1/00, C12Q1/68, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, 9-99932, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 15 April, 1997 (15. 04. 97), Par. Nos. [0009], [0010] Par. Nos. [0009], [0010] (Family: none)	1, 3-12 2
Y A	Jagannath B. Lamture, et al., "Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device" Nucleic Acids Research (1994), Vol. 22, No. 11, p.2121-2125	1, 3-12 2
Y A	M. Eggers, et al., "A Microchip for Quantitative Detection of Molecules Utilizing Luminescent and Radioisotope Reporter Groups" BioTechniques (1994), Vol. 17, No. 3, p.516-525	1, 3-12 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later than
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority
date and not in conflict with the application but cited to understand
the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such combination
being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 1999 (26. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
11 May, 1999 (11. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12M1/00, C12Q1/68, C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12M1/00, C12Q1/68, C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	J P. 9-99932, A. (大日本印刷株式会社) 15. 4月. 1997 (15. 04. 97) 段落番号【0009】～【0010】 段落番号【0009】～【0010】 (ファミリーなし)	1, 3-12 2
Y A	Jagannath B. Lamture, et. al., 「Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device」 Nucleic Acids Research(1994), Vol. 22, No. 11, p. 2121-2125	1, 3-12 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 04. 99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	M. Eggers, et. al., 「A Microchip for Quantitative Detection of Molecules Utilizing Luminescent and Radioisotope Reporter Groups」 BioTechniques(1994), Vol. 17, No. 3, p. 516-525	1, 3 - 12 2